





Notice d'utilisation

Epi proColon 2.0 CE

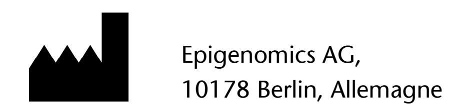
Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001)

Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)

Epi proColon Control Kit (M5-02-003)

Avant d'utiliser ce kit, veuillez lire attentivement la notice et suivre précisément les instructions afin de garantir la fiabilité et la pertinence des résultats.

REF M5-02-001, M5-02-002, M5-02-003



Epigenomics AG,
10178 Berlin, Allemagne



Contenu

1. Nom et Usage Prévu

Epi proColon 2.0 CE est un test qualitatif pour la détection par PCR en temps réel de la méthylation de l’ADN Septin9 dans de l’ADN converti au bisulfite provenant d’échantillons de plasma humain. La présence de Septin9 méthylé est associée à la présence d’un cancer colorectal, et peut aider à détecter ce type de cancer.

Epi proColon 2.0 CE est composé de l'Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), l’Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) et l’Epi proColon Control Kit (M5-02-003).

2. Résumé et Explication

Epi proColon 2.0 CE est un test de réaction en chaîne par polymérase (PCR) *in vitro* pour la détection qualitative de la méthylation du gène Septin9 dans de l'ADN isolé à partir de 3,5 ml de plasma de patient. Des résidus de cytosine de la région v2 du gène Septin9 deviennent méthylés dans un tissu colorectal cancéreux (CCR) contrairement au tissu intestinal normal. Cette méthylation anormale peut être mise en évidence par une amplification spécifique de l'ADN présent dans le flux sanguin. La détection de l'ADN d’un carcinome colorectal (CCR) dans le plasma utilisant comme biomarqueur la méthylation de Septin9 a été démontrée dans de multiples études de cas-témoins portant sur des patients souffrant de CCR et sur des groupes de contrôle ayant une coloscopie négative[1-3]. L’Epi proColon 2.0 CE effectué à partir de sang permet aux patients qui actuellement refusent la coloscopie de dépistage, une alternative raisonnable aux options de dépistage non-invasif du CCR.

3. Principes de la Procédure

L’Epi proColon 2.0 CE comporte deux étapes. Dans la première étape, l'ADN est extrait à partir de plasma, suivi d’une conversion au bisulfite de l'ADN purifié en utilisant l'Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001). Dans la seconde étape, l’ADN converti au bisulfite (ADNbis) est analysé par une PCR en duplex utilisant l'Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002), qui détecte à la fois la cible, l'ADN méthylé Septin9, et un contrôle interne, l'ADN de l’ACTB (ß-actine), pour évaluer l'adéquation de la quantité de l'ADN d'entrée. Les contrôles fournis dans l’Epi proColon Control kit (M5-02-003) sont requis comme contrôles positifs et négatifs pour chaque série.

L’extraction de l’ADN génomique du plasma d’un patient consiste à lier l’ADN génomique circulant à des petites particules magnétiques qui seront ensuite séparées du plasma à l’aide d’un aimant. Pour éliminer les impuretés restantes sur les particules magnétiques, plusieurs lavages seront effectués. Durant la phase d’élution, l’ADN purifié sera séparé des particules magnétiques par l´utilisation d´un tampon d´élution. L'éluat contenant l'ADN est ensuite soumis à une réaction chimique qui modifie spécifiquement les résidus cytosine non méthylés dans l'ADN. Le traitement au bisulfite est utilisé comme méthode de choix pour analyser la méthylation de l'ADN. La transformation est basée sur l’addition nucléophile d’un ion bisulfite à une cytosine et sur la réaction de désamination résultante, lors de laquelle se forme du sulfonate d’uracile, tandis que la cytosine méthylée – la 5-méthyl-cytosine – n’est pas désaminée et reste donc identique.

Les bloqueurs et les sondes utilisées dans la réaction de PCR suivante font la distinction entre les séquences méthylées et non méthylé. L’Epi proColon 2.0 CE détecte une séquence d’ADNbis contenant des sites CpG méthylés dans la région v2 du gène Septin9 et l’ADNbis total d’une région du gène ACTB. La partie du dosage en duplex analysant le gène Septin9 se compose d'amorces qui sont placés dans les régions sans dinucléotides CpG. Un bloqueur spécifique des séquences de la région non méthylées et convertis au bisulfite est ajouté afin que les séquences méthylées soient préférentiellement amplifiés. Une sonde de détection fluorescente spécifique pour les séquences méthylées de Septin9 est utilisée dans la réaction afin d'identifier exclusivement des séquences méthylées amplifiés pendant la réaction de PCR[4].

4. Matériels Fournis

4.1. Composants

Tableau 1: Composants de l’Epi proColon Plasma Quick Kit

Réactifs	Récipients	Volume
Epi proColon Lysis Binding Buffer	1 bouteille	125 ml
Epi proColon Wash A Concentrate	1 bouteille	60 ml
Epi proColon Magnetic Beads (billes magnétiques)	1 bouteille	4 ml
Epi proColon Wash B Concentrate	1 bouteille	7 ml
Epi proColon Elution Buffer	1 tube	6 ml
Epi proColon Bisulfite Solution	4 tubes	1,9 ml chacun
Epi proColon Protection Buffer	1 tube	1 ml

Tableau 2: Composants de l’Epi proColon Sensitive PCR Kit

Réactifs	Récipients	Volume
Epi proColon PCR Mix	2 tubes	800 µl chacun
Epi proColon Polymerase	1 tube	85 µl

Tableau 3: Composants de l’Epi proColon Control Kit

Réactifs	Récipients	Volume
Epi proColon Negative Control	6 tubes	3,6 ml chacun
Epi proColon Positive Control	6 tubes	3,6 ml chacun

4.2. Précaution

Lorsque vous travaillez avec des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire et des gants jetables. Nettoyer les surfaces contaminées avec de l'eau. Pour plus d'informations, consulter s'il vous plaît les fiches de données de sécurité (FDS) respectives de chaque composant disponibles sur notre site web (http://www.epiprocolon.com/en/laboratories/septin9-test/safety-data-sheets.html).

Epi proColon Lysis Binding Buffer et Epi proColon Wash A Concentrate: contient du TRITON X-100 et du Thiocyanate de guanidine.

Mentions de danger: EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique; H302: Nocif en cas d’ingestion; H312: Nocif par contact cutané; H318: Provoque des lésions oculaires graves; H332: Nocif par inhalation; H412: Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Conseils de prudence: P261: Éviter de respirer les aérosols; P273: Éviter le rejet dans l'environnement ; P301 + P312: EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise; P302 + P352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau et au savon; P305 + P351 + P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.


DANGER



Epi proColon Bisulfite Solution: contient une solution aqueuse de bisulfite d'ammonium

Mentions de danger: EUH031: Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique; H314: Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

Conseils de prudence: P264: Se laver les mains soigneusement après manipulation; P271: Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé; P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/; P305+351+338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer; P312: Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.





Epi proColon Protection Buffer: contient de l'Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchromanne-2-carboxylique, Alcool Tétrahydrofurfurylique

Mentions de danger: H319: Provoque une sévère irritation des yeux.

Conseils de prudence: P305 + P351 + P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.



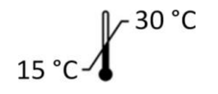


L'Epi proColon Wash B Concentrate, l'Epi proColon Elution Buffer, l'Epi proColon Magnetic Beads, l'Epi proColon PCR Mix, l'Epi proColon Polymerase, l'Epi proColon Positive Control, et l'Epi proColon Negative Control ne sont pas nocifs.

5. Conservation et Stabilité

Les réactifs fournis avec l'Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), l'Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) et l'Epi proColon Control Kit (M5-02-003) restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être stockés et utilisés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les produits au-delà de la date de péremption. Ne pas mélanger les composants provenant de différents lots de kit.

5.1. Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001)



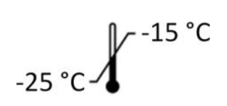
Conserver tous les réactifs de l'Epi proColon Plasma Quick Kit à une température comprise entre 15 et 30 °C.

Epi proColon Bisulfite Solution est sensible à l'oxygène. Utilisez uniquement des tubes non ouverts d'Epi proColon Bisulfite Solution. Jeter les tubes utilisés!

Conserver l'Epi proColon Wash A Buffer reconstitué et l'Epi proColon Wash B Buffer reconstitué à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 6 semaines au maximum.

Après la première utilisation, conserver tous les réactifs à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 6 semaines au maximum.

5.2. Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)



Conserver l'Epi proColon PCR Mix et l'Epi proColon Polymerase à une température comprise entre -25 et -15 °C.

Chaque tube d'Epi proColon PCR Mix peut être congelé et décongelé une seule fois. Après la première utilisation, conserver tous les réactifs à une température comprise entre -25 et -15 °C pendant 6 semaines au maximum.

5.3. Epi proColon Control Kit (M5-02-003)

-15 °C
-25 °C

Conserver l'Epi proColon Control Kit à une température comprise entre -25 et -15 °C.

6. Matériels Nécessaires, mais non Fournis

6.1. Equipement de Laboratoire Général

Le matériel de laboratoire général suivant est nécessaire pour effectuer le test Epi proColon 2.0 CE. Tous les équipements de laboratoire doivent être installés, étalonnés, utilisés et entretenus conformément aux recommandations du fabricant.

- Portoir pour tubes de 15 ml et de 2 ml (par ex. VWR International, référence. 211-0200, ou équivalent)
- Agitateur à disque rotatif (par ex. VWR International, référence. 445-2102; Carl Roth GmbH + Co. KG, référence. Y549.1, ou équivalent)
- Vortex (par ex. VWR International, référence 444-1372, ou équivalent)
- Bain thermostatique sec avec agitation (par ex. Thermomixer® comfort, Eppendorf, référence. 5355 000.011, avec bloc chauffant pour tube à réaction de 2 ml, Eppendorf, référence. 5362 000.019, ou équivalent)
- Pipettes avec volumes variables de capacité suivante 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (par ex. Eppendorf Reference®, pipette à volume variable, Eppendorf, référence 4910 000.042 et 4910 000.069, ou équivalent)
- Pipette à répétition capable de distribuer de façon répétitive des volumes dans une plage de volume réglable (par ex. Eppendorf Multipette® plus, Eppendorf, référence. 4981 000.019, ou HandyStep® electronic, Brand, référence. 705000/705001, ou équivalent)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes de 1,5/2,0 ml (par ex. Centrifuge 5417 R, Eppendorf, référence. 5407 000.317 avec rotor F-45-30-11, Eppendorf, référence. 5490 015.002, ou équivalent)
- Pipette multicanaux (par ex. Eppendorf Research® plus 8-Channel, 10 – 100 µl, Eppendorf, référence. 3122 000.035, ou équivalent)
- Centrifugeuse pour plaque PCR (par ex. Centrifuge 4-16, Qiagen, référence. 81320 et 81031, ou équivalent)
- Eprouvette graduée de 100 ml (par ex. Carl Roth, référence. C177.2, ou équivalent) ou pipette sérologique de 50 ml (par ex. Fisher Scientific, référence. 10212581, ou équivalent)

6.2. Consommables Généraux de Laboratoire et Réactifs

- Ethanol absolu (pour biologie moléculaire, ≥99,5 %, Merck KGaA, référence. 1.08543.0250)
- Tubes à centrifuger en polypropylène à base conique, PP/stérile (par ex. Sarstedt, référence. 62.554.502, ou équivalent)

- Microtube de 2,0 ml à fond rond, avec bouchon PP attaché et avec un crochet de verrouillage du couvercle (par ex. Sarstedt SafeSeal, référence. 72.695.400 ou Eppendorf Safe-Lock™, référence. 0030 120.094, ou équivalent)
- Embouts pour pipette avec protection contre les aérosols, par ex. ep Dualfilter T.I.P.S®, Eppendorf:
    - o 2 – 100 µl, référence. 0030 077.547, ou équivalent
    - o 50 – 1000 µl, référence. 0030 077.571, ou équivalent
- Pointes de distribution pour pipette à répétition pour des volumes de 0,5 ml, 1 ml, 10 ml, 25 ml, par ex. Combitips plus®, Eppendorf:
    - o 0,5 ml, référence. 0030 069.226, ou équivalent
    - o 1 ml, référence. 0030 069.234, ou équivalent
    - o 10 ml, référence. 0030 069.269, ou équivalent
    - o 25 ml, référence. 0030 069.293, ou équivalent
- Pipettes de transfert jetables, non-stériles emballées en vrac, longueur de 15 cm (environ 6 pouces), diamètre de la tige de 5 mm, une capacité d'environ 5 ml (par ex. VWR pipette de transfert jetable non-stérile, référence. 612-4520, ou équivalent)
- Pipettes de transfert jetables, non-stériles emballées en vrac, longueur 22,5 cm (environ 9 pouces), diamètre de la tige de 5 mm, une capacité d'environ 5 ml (par ex. pipette de transfert jetable, graduée, Carl Roth, référence. EA61.1, ou équivalent)
- Plaques 96 puits pour la conservation de l'ADN (par ex. MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml, Applied Biosystems (Life Technologies Co.), référence. 4346906, ou équivalent)
- Film ou feuille adhésif pour plaque de conservation de l'ADN (par ex. VWR Thermalseal film étanche pour PCR, référence. 391-1254 ou Eppendorf feuille de stockage (auto-adhésive), référence. 0030 127889, ou équivalent)
- Applicateur de film pour former un joint étanche entre une microplaque et un film adhésif (par ex. MicroAmp® Adhesive Film Applicator, Applied Biosystems, référence. 4333183)
- Sachets plastiques refermables, 10 x 15 cm (par ex. Carl Roth, référence. P279.2, ou équivalent) pour éliminer les plaques PCR utilisées.
- Bain-marie pour incubation à 37 °C.
- Cryotube, 5 ml, qui tiennent droit (par ex. VWR, référence. 479-0285, ou équivalent)
- Tubes de prélèvement de sang:
    - o Tubes de Prélèvement de Sang BD Vacutainer® K_2EDTA 10 ml (Becton Dickinson, référence. 367525) ou
    - o S-Monovette® 9 ml K3E (Sarstedt, référence. 02.1066.001) ou
    - o S-Monovette® 8,5 ml CPDA (Sarstedt, référence. 01.1610.001)

6.3. Equipement Spécial Requis et Consommables

L'équipement spécial et les consommables suivants sont nécessaires pour effectuer le test Epi proColon 2.0 CE et ne peuvent pas être remplacés par un autre équipement.

Si le test Epi proColon 2.0 CE est exécuté sur **l'Applied Biosystems 7500 Fast ou 7500 Fast Dx instruments PCR**:

- Applied Biosystems 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument avec le logiciel de Détection de Séquence "SDS" v1.4 avec le Module 21 CFR Part 11 (Life Technologies Co., référence. 4406984 ou 4406985) ou

  Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Life Technologies Co., référence. 4351106 or 4351107) avec le logiciel de Détection de Séquence "SDS" v1.4 avec le Module 21 CFR Part 11 (Life Technologies Co., référence. 4377355)

- Plaque de réaction optique 96 puits MicroAmp® Fast avec code barre, 0,1 ml (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 20 plaques, référence. 4346906; 200 plaques, référence. 4366932)
- Film adhésif optique pour plaque 96 et 384 puits MicroAmp® (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 25 feuilles, référence. 4360954 ou 100 feuilles, référence. 4311971)

Si le test Epi proColon 2.0 CE est exécuté sur le **Roche LightCycler 480 instruments I and II**:

- LightCycler 480 Instrument I, avec bloc chauffant 96 puits (Roche Applied Science, référence. 05015278001) et avec la version du logiciel 1.5.x ou

  LightCycler 480 Instrument II, avec bloc chauffant 96 puits (Roche Applied Science, référence. 05015278001) et avec la version du logiciel 1.5.x
- Plaque 96 puits LightCycler 480 avec feuilles adhésives (Roche Applied Science, référence. 04729692001)
- Feuilles adhésives LightCycler 480 (Roche Applied Science, référence. 04729757001)

Equipement additionnel requis, compatible avec toutes les configurations d'instruments de PCR en Temps Réel:

- Séparateur Magnétique: aimant DynaMag™-15 (Invitrogen, référence. 123.01D)
- Séparateur Magnétique: aimant DynaMag™-2 (Invitrogen, référence. 123.21D)

6.4. Exigences d'Installation

L'installation, l'étalonnage, la vérification des performances, et le maintien de l'Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR Instrument, de l'Applied Biosystems 7500 Fast PCR Instrument ou du Roche LightCycler 480 Instrument I ou II doivent être effectués conformément aux instructions du fabricant.

Remarque: L'étalonnage mensuel du bruit de fond tel que décrit dans la procédure de maintenance du constructeur est obligatoire pour l'Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR Instrument et l'Applied Biosystems 7500 Fast PCR Instrument.

7. Mises en Garde et Précautions

7.1. Précautions de Laboratoire

Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour minimiser le risque de contamination croisée entre les échantillons pendant et après l'extraction, la conversion au bisulfite, et la procédure de purification de l'ADN.

Evitez l'introduction des nucléases dans les échantillons au cours de la procédure d'extraction. Afin d'éviter toute contamination entre les échantillons des patients, nous vous conseillons d'utiliser des pipettes à usage unique et des pointes de pipettes à usage unique. Cette procédure est dédiée exclusivement à une utilisation en laboratoire professionnel et nécessite une certaine familiarité avec les méthodes d'extraction d'ADN et de PCR en temps réel.

Pour éviter la contamination par des produits d'amplifications générés pendant une PCR précédente, nous recommandons une stricte séparation des activités pré-PCR (par exemple l'extraction de l'ADN à partir du plasma et sa purification, préparation de la PCR) et des activités post-PCR (par exemple PCR en temps réel). En outre, nous recommandons que les plaques PCR utilisées soient disposées d'une manière à ce qu'aucun produit de PCR ne peut être libéré. Par exemple, les plaques de PCR utilisées doivent être placées dans un sac en plastique référable immédiatement après leur retrait de l'appareil de PCR, le sac est fermé et éliminé dans un conteneur dédié aux déchets. Ne jamais entreposer une plaque de PCR utilisée en dehors de l'appareil de PCR. Ne jamais ouvrir une plaque de PCR utilisée.

7.2. Etat Microbiologique et Infectieux

Le produit ne contient pas de substances infectieuses ou des agents qui provoquent des maladies chez les humains ou les animaux.

Les échantillons de sang et de plasma humains analysés avec ce test doivent être manipulés comme potentiellement infectieux en utilisant des procédures de laboratoire sures telles que celles décrites dans la Biosécurité dans les Laboratoires Microbiologiques et Biomédicaux, la directive 2000/54/CE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail, ou dans d'autres procédures de biosécurité appropriées.

8. Prélèvement d'Èchantillon et leur Manipulation

8.1. Prélèvement sanguin et Conservation du Sang

Le prélèvement sanguin et la conservation du sang peuvent être effectués conformément aux conditions suivantes:

- Pour effectuer le prélèvement sanguin, utilisez les tubes Vacutainer® K_2EDTA de 10 ml ou S-Monovette® 9 ml Potassium-EDTA. Suivez les recommandations du fabricant pour effectuer le prélèvement sanguin. Le sang devrait être traité immédiatement. Le sang peut être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 24 heures au maximum avant la préparation de plasma. Ne pas congeler l'échantillon de sang.
- Comme alternative, le tube S-Monovette® 8,5 ml CPDA peut être utilisé pour le prélèvement sanguin. Suivez les recommandations du fabricant pour effectuer le prélèvement sanguin. Le sang devrait être traité immédiatement. Le sang peut être conservé dans le tube S-Monovette® de 8,5 ml à une température comprise entre 15 et 25 °C pendant 72 heures au maximum. Ne pas congeler l'échantillon de sang.

8.2. Préparation de l'Echantillon de Plasma et Conservation du Plasma

- Enlever le frein de la centrifugeuse pour éviter la rupture des couches cellulaires.
- Centrifuger le sang dans un tube de collecte de sang à 1350 ± 150 rcf pendant 12 min. Pour la conversion de rotations par minute (rpm) en rcf, reportez-vous au manuel d'utilisation de la centrifugeuse.
- Retirer le tube de collecte de sang de la centrifugeuse.
- Utiliser une nouvelle pipette de transfert jetable de 15 cm pour transférer le plasma du tube de collecte dans un tube à centrifuger en polypropylène de 15 ml à fond conique.
- Centrifuger le plasma dans le tube à centrifuger de 15 ml pendant 12 min à 1350 ± 150 rcf.
- Utiliser une nouvelle pipette de transfert jetable extra longue (22,5 cm) ou une pipette sérologique, transférer 3,5 ml de plasma dans un cryotube étiqueté ou dans un tube à centrifuger.
- Les échantillons de plasma peuvent être conservés à une température comprise entre -15 et -25 °C pendant 4 semaines au maximum.
- Lorsque vous utilisez les tubes Vacutainer® K_2EDTA de 10 ml, l'échantillon de plasma peut être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 18 heures au maximum.

9. Procédure du Test

Une pipette à répétition est recommandée pour distribuer de façon répétée les réactifs suivants: l'Epi proColon Lysis Binding Buffer, l'Epi proColon Magnetic Bead Suspension, l'éthanol dans l'étape 9.2.3., l'Epi proColon Wash A Buffer, l'Epi proColon Wash B Buffer, l'Epi proColon Elution Buffer, l'Epi proColon Bisulfite Solution, l'Epi proColon Protection Buffer et le PCR Master Mix. En outre, nous recommandons fortement d'utiliser un agitateur à disque rotatif et pas un agitateur à bascule, et de pipeter l'ADN extrait et traité au bisulfite avec des pipettes de référence.

9.1. Préparation des Réactifs du Test

9.1.1. Préparation de l'Epi proColon Wash A Buffer

- Ajouter 60,0 ml d'ethanol absolu (pour biologie moléculaire, ≥99,5 %) à l'Epi proColon Wash A Concentrate en utilisant une éprouvette graduée stérile ou une pipette sérologique.
- Fermer le couvercle, mélanger soigneusement en retournant la bouteille 5 fois, en évitant la formation de mousse. Etiqueter le flacon avec la date de dilution et cocher la case "Ethanol added".
- Conserver l'Epi proColon Wash A Buffer reconstitué à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 6 semaines au maximum.

9.1.2. Préparation de l'Epi proColon Wash B Buffer

- Ajouter 40,0 ml d'Ethanol Absolu (pour biologie moléculaire, ≥99,5 %) à l'Epi proColon Wash B Concentrate en utilisant une éprouvette graduée stérile ou une pipette sérologique.
- Fermer le couvercle, mélanger soigneusement en retournant la bouteille 5 fois, en évitant la formation de mousse. Etiqueter le flacon avec la date de dilution et cocher la case "Ethanol added".
- Conserver l'Epi proColon Wash B Buffer reconstitué à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 6 semaines au maximum.

9.2. Extraction de l'ADN et Conversion au Bisulfite à partir de Plasma de Patient

L'Epi proColon 2.0 CE contient assez de réactifs pour analyser jusqu'à 32 échantillons, incluant les contrôles. Un Epi proColon Positive Control et un Epi proColon Negative Control doivent être inclus dans chaque série indépendante. Comme il y a quatre tubes à usage unique d'Epi proColon Bisulfite Solution, nous vous recommandons de faire jusqu'à 4 séries indépendantes (par exemple 4 séries de 8 échantillons chacun).

Remarque: Une centrifugation brève des microtubes (défini comme "Centrifuger brièvement les tubes") est nécessaire à plusieurs étapes de cette procédure pour éliminer les gouttes du couvercle ou pour recueillir le liquide restant. Il est recommandé de centrifuger pendant 10 à 20 sec à 1000 ± 150 rcf à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse. Éviter une centrifugation plus forte pour empêcher de compacter le culot des billes magnétiques dans des étapes spécifiques.

Remarque: Mélanger les tubes et les récipients à l'aide d'un vortex est nécessaire à plusieurs étapes de cette notice pour assurer un mélange homogène du liquide. Il est recommandé d'utiliser un vortex réglé à vitesse moyenne pendant 5 à 10 sec.

9.2.1. Décongélation des Echantillons de Plasma et des Epi proColon Positive et Negative Control

- Décongeler un Epi proColon Positive Control et un Epi proColon Negative Control pendant environ 30 min à une température comprise entre 15 et 30 °C.
- Si un échantillon de plasma congelé est utilisé, décongeler l'échantillon pendant environ 30 min à une température comprise entre 15 et 30 °C.
- Commencer la lyse dans les 60 min après décongélation.

9.2.2. Lyse

Remarque: Avant son utilisation, secouer brièvement l'Epi proColon Lysis Binding Buffer et vérifier visuellement l'absence de précipités. Si des précipités sont présents, chauffer l'Epi proColon Lysis Binding Buffer dans un bain-marie à 37 °C pendant 60 min et agiter doucement jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissous. Laisser revenir l'Epi proColon Lysis Binding Buffer à température ambiante avant utilisation.

- Ajouter dans un tube à centrifuger étiqueté de 15 ml les éléments suivants:
    - 3,5 ml de plasma, ou d'Epi proColon Positive Control, ou d'Epi proColon Negative Control
    - 3,5 ml d'Epi proColon Lysis Binding Buffer
- Fermer le tube et mélanger au vortex.
- Incuber le tube sur la paillasse à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 10 ± 1 min.

9.2.3. Liaison de l'ADN

Remarque: Une suspension homogène de billes dans la suspension Epi proColon Magnetic Beads est indispensable pour une performance optimale. Toute variation de la quantité de billes spécifiée peut donner lieu à des résultats erronés. Pour assurer une bonne concentration des particules magnétiques, la bouteille doit être mélangée vigoureusement juste avant le pipetage jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de sédiments visibles au fond de la bouteille. Assurez-vous également que la suspension est homogène entre les étapes de pipetage.

- Ajouter au tube à centrifuger de 15 ml dans l'ordre suivant:
    - 90 µl d'Epi proColon Magnetic Beads (fraichement resuspendu)
    - 2,5 ml d'ethanol absolu (pour biologie moléculaire, ≥99,5 %)
- Fermer le tube et mélanger en inversant le tube 5-6 fois.
- Mettre le tube de 15 ml sur un agitateur rotatif.
- Faire tourner à vitesse moyenne (env. 10 - 20 rpm) à température ambiante pendant 45 ± 5 minutes. Ajuster l'angle de rotation à environ 35 - 45 degrés.

9.2.4. Lavage de l'ADN

Remarque: Avant de commencer la procédure de lavage, régler le bain thermostatique sec avec agitation à 80 ± 2 °C pour une utilisation ultérieure dans les étapes d'élution et de conversion au bisulfite.

- Placer le tube de 15 ml dans le portoir magnétique DynaMag™-15 pendant 5 - 10 min.
- Eliminer le surnageant avec précaution en versant le tube. Veiller à ne pas enlever les particules magnétiques.
    - Ajouter 1,5 ml d'Epi proColon Wash A Buffer
- Remettre complètement en suspension les particules magnétiques au vortex.
- Transférer la suspension de particules magnétiques dans un microtube marqué de 2,0 ml en utilisant une pipette de transfert jetable extra longue (22,5 cm).
- Recueillir le reste des particules magnétiques dans le tube de 15 ml avec la pipette de transfert jetable et les transférer dans le microtube de 2,0 ml.
- Placer le tube dans le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Enlever autant que possible le tampon à l'aide d'une pipette transfert jetable de 15 cm tandis que le tube est encore dans le portoir magnétique DynaMag™-2. Veiller à ne pas éliminer les particules magnétiques.
- Centrifuger brièvement le tube.
- Placer le microtube de 2,0 ml dans le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Enlever autant que possible le tampon résiduel en utilisant une pipette de référence de 10 - 100 µl tandis que le tube est encore sur le portoir magnétique.

9.2.5. Elution

- Transférer le microtube dans un portoir non magnétique.
- Mélanger l'Epi proColon Elution Buffer au vortex.
- Ajouter 100 µl d'Epi proColon Elution Buffer à chaque tube.
- Fermer le tube.
- Remettre en suspension les particules magnétiques au vortex.
- Placer le microtube dans le bain thermostatique sec avec agitation, réglé sur 1000 ± 100 rpm, et incuber à 80 ± 2 °C pendant 10 ± 1 min.
- Centrifuger brièvement le tube.
- Placer le microtube dans le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Transférer l'éluat complet, tandis que le tube est encore dans le portoir magnétique, (~100 µl de solution d'ADN) dans un nouveau microtube de 2,0 ml.
- Jeter le microtube de 2 ml contenant les billes magnétiques.

9.2.6. Conservation de l'ADN Extrait

Remarque: Si l'ADN extrait n'est pas utilisé immédiatement, garder le matériel à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 24 heures au maximum. **Ne pas congeler** l'ADN extrait.

9.2.7. Conversion au Bisulfite

Remarque: L'Epi proColon Bisulfite solution est sensible à l'oxygène. Utilisez uniquement des tubes d'Epi proColon Bisulfite Solution non ouverts. Ne pas conserver, mais jeter toute solution restante!

- Ajouter les réactifs suivants dans les microtubes de 2,0 ml contenant l'éluat (~ 100 µl de solution d'ADN):
  - 150 µl d'Epi proColon Bisulfite Solution
  - 25 µl d'Epi proColon Protection Buffer
- Fermer le tube et mélanger la réaction bisulfite au vortex.
- Centrifuger brièvement le tube.
- Placer le tube dans le bain thermostatique sec avec agitation et incuber pendant 45 ± 5 min à 80 ± 2 °C **sans** agitation.
- Sortir le tube du bain thermostatique sec avec agitation immédiatement après 45 ± 5 min.
- Régler la température du bain thermostatique sec avec agitation sur 23 ± 2 °C, ou régler un second bain thermostatique à agitation sur 23 ± 2 °C pour une utilisation ultérieure.

9.2.8. Etape de Liaison

Remarque: Une suspension homogène de billes dans la suspension Epi proColon Magnetic Beads est indispensable pour une performance optimale. Toute variation de la quantité de billes spécifiée peut donner lieu à des résultats erronés. Pour assurer une bonne concentration des particules magnétiques, la bouteille doit être bien mélangée juste avant le pipetage jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de sédiments visibles au fond de la bouteille. Assurez-vous également que la suspension est homogène entre les étapes de pipetage.

- Centrifuger brièvement le microtube de 2,0 ml contenant la réaction de bisulfite.
- Ajouter les réactifs suivants dans le microtube:
  - 1000 µl d'Epi proColon Wash A Buffer
  - 20 µl d'Epi proColon Magnetic Beads (fraichement resuspendu).
- Mélanger au vortex.
- Attendre que le bain thermostatique sec avec agitation ait atteint 23 ± 2 °C.
- Placer le microtube dans le bain thermostatique sec avec agitation réglé sur 1000 ± 100 rpm et incuber à 23 ± 2 °C pendant 45 ± 5 min.
- Centrifuger brièvement le tube.

- Placer le tube sur le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Enlever autant que possible du liquide en utilisant une nouvelle pipette de transfert jetable de 15 cm tandis que le tube est encore sur le portoir magnétique. Veiller à ne pas prélever les particules magnétiques.

9.2.9. **Premier Lavage**

- Retirer l’échantillon du support magnétique pour le lavage et mélanger au vortex et ajouter:
    - 800 µl d’Epi proColon Wash A Buffer.
- Resuspendre au vortex.
- Centrifuger brièvement le tube.
- Placer le tube sur le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Enlever autant que possible du liquide en utilisant une nouvelle pipette de transfert jetable de 15 cm tandis que le tube est encore sur le portoir magnétique. Veiller à ne pas prélever les particules magnétiques.

9.2.10. **Deuxième Lavage**

- Retirer l’échantillon du support magnétique pour le lavage et mélanger au vortex et ajouter:
    - 800 µl d’Epi proColon Wash B Buffer.
- Resuspendre au vortex.
- Centrifuger brièvement le tube.
- Placer le tube sur le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Enlever autant que possible du liquide en utilisant une nouvelle pipette de transfert jetable de 15 cm tandis que le tube est encore sur le portoir magnétique. Veiller à ne pas prélever les particules magnétiques.

9.2.11. **Troisième Lavage**

- Retirer l’échantillon du support magnétique DynaMag™-2 pour laver et mélanger au vortex et ajouter:
    - 400 µl d’Epi proColon Wash B Buffer.
- Resuspendre au vortex.
- Centrifuger brièvement le tube.
- Placer le tube sur le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Enlever autant que possible du liquide en utilisant une nouvelle pipette de transfert jetable de 15 cm tandis que le tube est encore sur le portoir magnétique. Veiller à ne pas prélever les particules magnétiques.
- Centrifuger brièvement le tube.
- Placer le tube sur le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Enlever autant que possible du liquide en utilisant une pipette de référence de 10 - 100 µl tandis que le tube est encore sur le portoir magnétique. Veiller à ne pas prélever les particules magnétiques.

9.2.12. **Séchage**

Remarque: Ne pas augmenter le temps ou la température de séchage. Trop sécher peut provoquer une perte de rendement de l’ADNbis obtenu!

- Ouvrir le couvercle du microtube.
- Placer le microtube dans le bain thermostatique sec avec agitation.
- Laisser le culot sécher pendant 10 ± 1 min à 23 ± 2 °C sans agitation.

9.2.13. Elution

- Transférer le microtube dans un portoir non magnétique et ajouter:
  - 60 µl d'Epi proColon Elution Buffer.
- Fermer le tube.
- Resuspendre les particules magnétiques au vortex.
- Incuber pendant 10 ± 1 min à 23 ± 2 °C dans un bain thermostatique sec avec agitation réglé à 1000 ± 100 rpm.
- Centrifuger brièvement le tube.
- Placer le tube sur le portoir magnétique DynaMag™-2 pendant 2 - 6 min.
- Transférer l'éluat complet (~ 60 µl de solution d'ADN) dans une plaque 96 puits en utilisant une pipette de référence de 10 – 100 µl et sceller la plaque avec un film adhésif avec un applicateur de film adhésif.
- Préparer la plaque pour la conservation de l'ADNbis en fonction de la disposition recommandée dans le Tableau 4.

Tableau 4: Modèle Recommandé pour une Plaque d'ADNbis.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC#	E7										
B	NC$	E8										
C	E1	E9										
D	E2	E10										
E	E3	E11										
F	E4	E12										
G	E5	E13										
H	E6	E14										

#Epi proColon Positive Control, $Epi proColon Negative Control

9.2.14. Conservation de l'ADN Converti au Bisulfite

Lorsque l'ADN extrait et traité au bisulfite n'est pas utilisé immédiatement, il peut être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 24 heures au maximum ou à une température comprise entre -25 et -15 °C pendant 72 heures au maximum.

9.3. Préparation de la PCR

Remarque: Chaque échantillon d'ADN converti au bisulfite (ADNbis) (échantillon de patient, ou Epi proColon Positive Control, ou Epi proColon Negative Control) doit être testé en trois exemplaires.

Remarque: Centrifuger le tube contenant l'Epi proColon polymérase avant son utilisation pendant 10 - 20 sec à 1000 ± 150 rcf à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse pour éliminer les gouttes du couvercle.

9.3.1. Préparation du PCR Master Mix

- Décongeler 1 ou 2 tubes d'Epi proColon PCR Mix selon le nombre souhaité de déterminations des échantillons de patient et de contrôle (voir Tableau 5).
- Mélanger au vortex le(s) tube d'Epi proColon PCR Mix pendant 10 - 15 sec. Centrifuger brièvement le tube(s).
- Mettre le volume correspondant d'Epi proColon PCR Mix et d'Epi proColon Polymerase comme indiqué dans le Tableau 5 dans un microtube de 2,0 ml.
- Mélanger le PCR Master Mix à l'aide d'un vortex.
- Centrifuger brièvement le PCR Master Mix pour éliminer les gouttes du couvercle.

Remarque: Ne pas conserver le PCR Master Mix, utiliser le immédiatement. Recongeler l'Epi proColon PCR Mix et l'Epi proColon Polymerase non utilisés directement après usage.

Remarque: Pour une seule PCR, 16 µl d'Epi proColon PCR Mix et 0,8 µl d'Epi proColon Polymerase sont nécessaires.

Tableau 5: Préparation du PCR Master Mix.

Composants	Volume pour 8 Déterminations (24 PCRs)	Volume pour 16 Déterminations (48 PCRs)	Volume pour 24 Déterminations (72 PCRs)	Volume pour 32 Déterminations (96 PCRs)
Epi proColon PCR Mix	383,8 µl	767,7 µl	1151,5 µl	1535,4 µl
Epi proColon Polymerase	19,4 µl	38,7 µl	58,1 µl	77,4 µl

Tableau 6: Configuration de la Plaque PCR Recommandé.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC#	PC#	PC#	E7	E7	E7						
B	NC$	NC$	NC$	E8	E8	E8						
C	E1	E1	E1	E9	E9	E9						
D	E2	E2	E2	E10	E10	E10						
E	E3	E3	E3	E11	E11	E11						
F	E4	E4	E4	E12	E12	E12						
G	E5	E5	E5	E13	E13	E13						
H	E6	E6	E6	E14	E14	E14						

#Epi proColon Positive Control, $Epi proColon Negative Control

Remarque: Si la PCR est effectuée avec l'appareil de PCR Applied Biosystems 7500 Fast PCR Instrument ou l'appareil 7500 Fast Dx PCR Instrument avec le logiciel SDS v1.4 suivre les instructions des paragraphes 10 et 13.

Si la PCR est effectuée avec l'appareil Roche LightCycler 480 Instrument I suivre les instructions des paragraphes 11 et 13.

Si la PCR est effectuée avec l'appareil Roche LightCycler 480 Instrument II suivre les instructions des paragraphes 12 et 13.

10. Analyse avec l'Applied Biosystems 7500 Fast et 7500 Fast Dx PCR Instruments

10.1. Logiciel Requis

Ce produit a été validé en utilisant le logiciel SDS v1.4 avec le Module 21 CFR Part 11.

10.2. Préparation de la Plaque PCR (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

- Préparer la plaque PCR. La disposition de la plaque, comme indiqué dans le Tableau 6, est recommandée.
- Mettre 15 µl de PCR Master Mix dans les puits souhaités de la plaque de réaction 96-puits MicroAmp® Fast Optical 96-well.
- Centrifuger brièvement la plaque de conservation de l'ADNbis créée dans le paragraphe 9.2.13 si nécessaire pendant 1 min à 1000 ± 100 rcf avec une centrifugeuse pour plaque.
- Ajouter 15 µl de solution d'ADNbis dans les puits respectifs de la plaque PCR.
- Sceller la plaque avec un film adhésif MicroAmp® Optical.
- Centrifuger brièvement la plaque avec une centrifugeuse pour plaque pendant 1 min à 1000 ± 100 rcf.

Remarque: La plaque PCR ainsi préparée peut être conservée au réfrigérateur à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 4 heures au maximum.

10.3. Chargement de la Plaque (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Remarque: Le PCR Master Mix ne contient pas de ROX ou toute autre colorant de référence. En conséquence, le paramètre de référence passif doit être réglé sur "none".

Remarque: Il est recommandé de sauvegarder un fichier modèle (*.sdt) avec les paramètres de cycle et d'analyse définis.

- Démarrer la version SDS v1.4 du logiciel.
- Charger le modèle de fichier d'expérience spécifié ou créer un nouveau document de plaque.
- Cliquer sur "Create New Document".
- Définir le document de la plaque suivant les instructions ci-dessous:
  - Assay: Standard Curve (Absolute Quantification)
  - Container: 96-Well Clear
  - Template: Blank Document (ou sélectionner le fichier modèle respectif de l'Epi proColon 2.0 CE)
  - Run Mode: Standard 7500.
- Cliquer sur "Next".
- Cliquer sur "New Detector…".
- Créer un nouveau détecteur en utilisant les propriétés suivantes:
  - Name: Septin9
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter dye: FAM
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Red.
- • Cliquer sur "Create Another" et définir les propriétés suivantes:
  - Name: ACTB
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter dye: JOE
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Green.

- Cliquer sur “ok”.
- Sélectionnez les deux détecteurs et cliquez sur "Add >>" pour attribuer les détecteurs au document de la plaque.
- Sélectionnez "(none)" dans le menu déroulant de " Passive Reference "
- Cliquer sur “Done”.
- Aller à l’onglet “Setup” et “Plate”.
- Sélectionner tous les 96 puits de la plaque.
- Aller à la commande de menu “View” et ouvrir le “Well Inspector”.
- Sélectionner les détecteurs “Septin9” et “ACTB”.
- Vérifier que le réglage de la Référence Passive est sur “(none)” (voir Figure 1).
- Cliquer sur “Close”.
- Allez à l'onglet “Instrument” pour programmer les paramètres du cycle tel que décrit dans le Tableau 7
- Modifier les paramètres suivants:
    - Sample Volume: 30 µl,
    - Run Mode: Standard 7500,
    - Data Collection: Stage 2, Step 2.
- Créer un “Thermal Profile” avec 3 étapes.
- Créer un “Stage 2” ayant 3 étapes, et un “Stage 1” et “Stage 3” ayant 1 étape.
- Entrer “repetitions”, “target temperature”, et “hold time” conformément au Tableau 7
- Changer le “Ramp Rate” conformément au Tableau 7.
- Définir “Data Collection” pour “Stage 2, Step 2 (55.5 @ 0:35)”.
- Confirmer les paramètres du protocole du cycle thermique conformément au Tableau 7 (voir Figure 2).
- Sauvegarder le document du cycle de la plaque sous un nom de fichier approprié.
- Ouvrir le tiroir.
- Placer la plaque PCR dans le cadre (position A1 va dans le coin supérieur gauche), veiller à ce que la plaque s'insère précisément dans le cadre. Fermer le tiroir.
- Cliquer sur “Start” pour commencer le cycle.

Tableau 7: Programme du Cycle Thermique pour l’Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx

Program Parameter	Denaturation	Cycling			Holding
Stage	”Stage 1”	”Stage 2”			”Stage 3”
Repetitions	1	45			1
Step	1	1	2	3	1
Target [°C]	94	62	55.5	93	40
Hold [mm:ss]	20:00	00:05	00:35	00:30	00:05
Auto Increment		0	0	0	
Ramp Rate [%]	40	80	80	40	80
Data Collection	Stage 2, Step 2 (55.5 @ 0:35)				

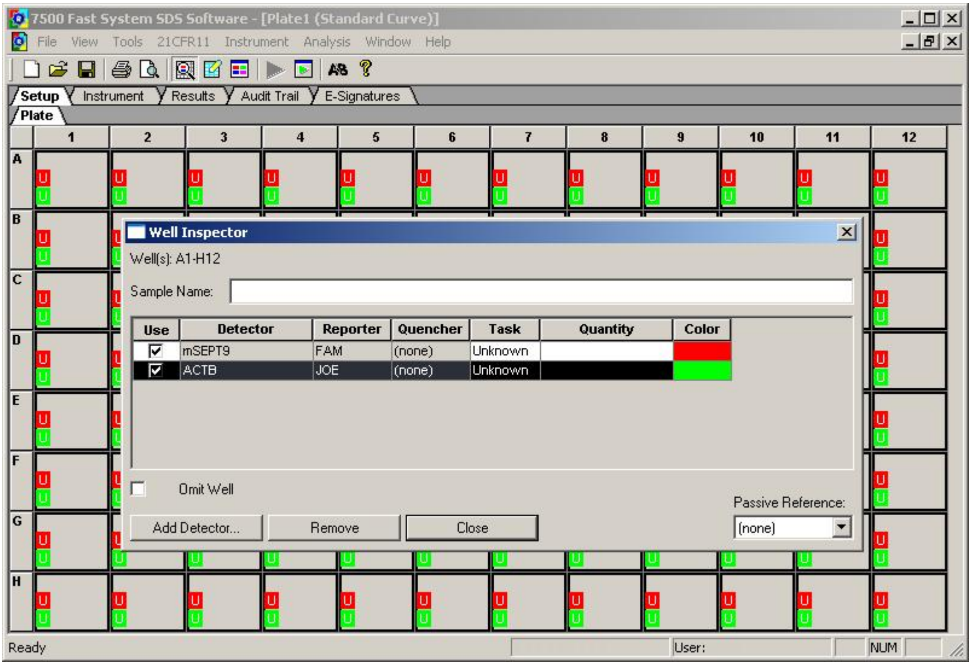


Figure 1: Capture d'écran du logiciel SDS v1.4 après avoir confirmé les paramètres dans la fenêtre "Well Inspector».

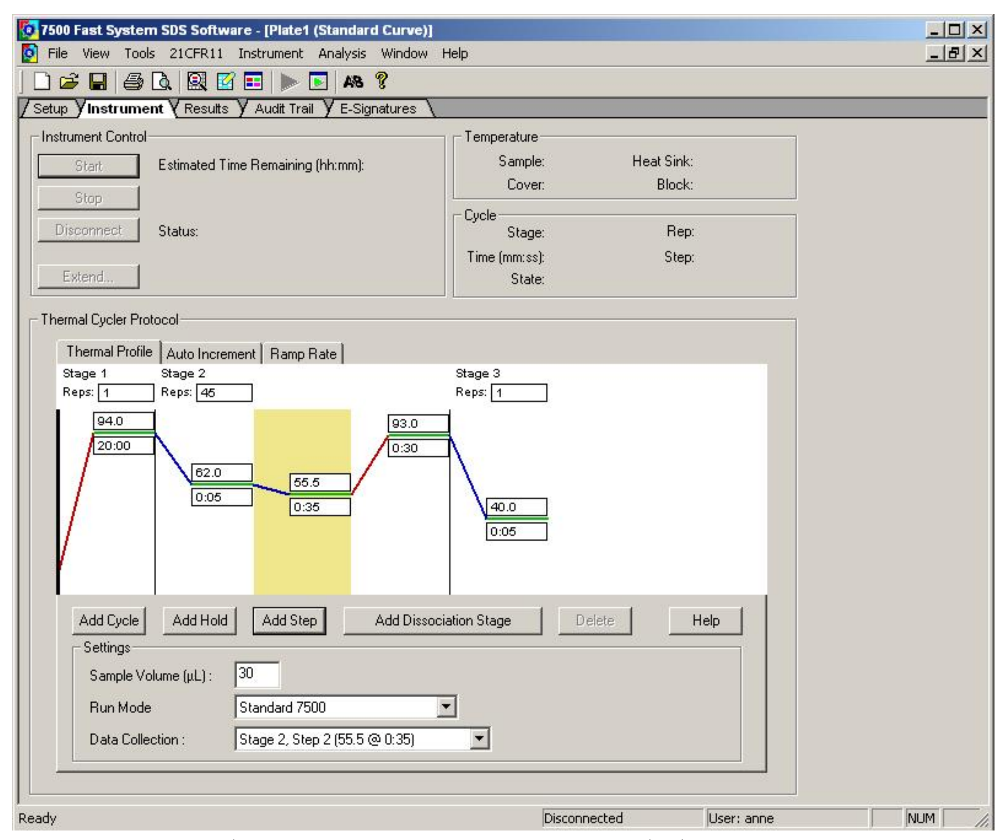


Figure 2: Capture d'écran du logiciel SDS v1.4 après avoir réglé le programme du cycle de PCR et le mode de détection.

10.4. **Paramètres d’Analyse (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)**

Remarque: Analyser les séries de PCR avec la version du logiciel SDS v1.4 seulement.

- Après la fin du programme du cycle PCR, cliquer sur “ok”.
- Sélectionner l’onglet “Results”, puis sélectionner l’onglet “Amplification Plot“.
- Régler “Analysis Setting” pour le détecteur Septin9 de la façon suivante:
    - o Manual Ct, Threshold: 50000 (appears as “5.0e+004”)
    - o Manual baseline, Start (cycle): 10
    - o Manual baseline, End (cycle): 22
- Régler “Analysis Setting” pour le détecteur ACTB de la façon suivante:
    - o Manual Ct, Threshold: 25000 (appears as “2.5e+004”)
    - o Manual baseline, Start (cycle): 10
    - o Manual baseline, End (cycle): 22
- Cliquer sur “Analyze”.
- Cliquer sur “Save”.
- Les valeurs Ct de Septin9 et les valeurs Ct d’ACTB sont calculées automatiquement.
- Sélectionner les puits à analyser.
- Les courbes d’amplification sont affichées dans l'onglet “Amplification Plot”.
- Les valeurs de Ct sont affichés dans l'onglet “Report”.

Remarque: Chaque courbe d'amplification doit être inspectée visuellement. Les courbes d'amplification, qui traversent le seuil en raison de points de données incohérentes (des pics de bruit de fond) ou d’une forme linéaire de la courbe doivent être considérées comme négatives. Des exemples sont fournis dans la Figure 3.

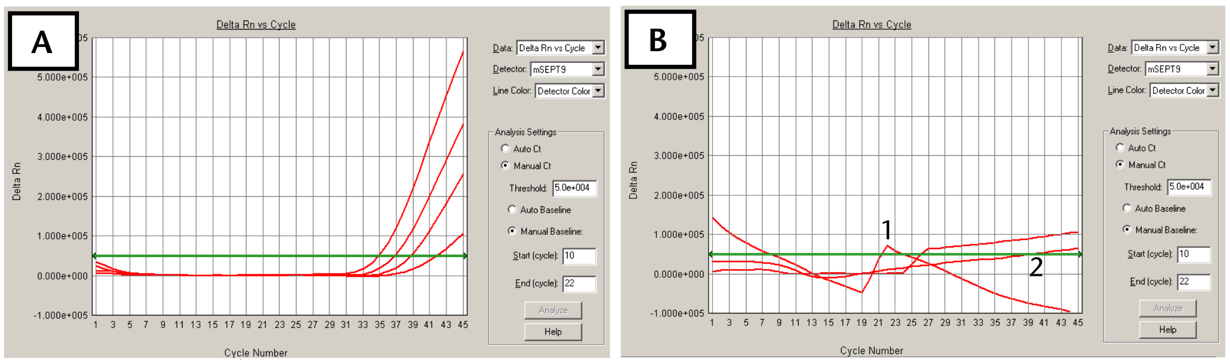


Figure 3: Captures d'écran des courbes d'amplification de Septin9 en utilisant l’Applied Biosystems 7500 Fast.
A: Exemples de courbes positives valides. B: Exemples de courbes négatives en raison de points de données incohérentes (1) ou forme linéaire de la courbe (2).

10.5. Validité de la Série en utilisant les Contrôles Epi proColon (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Toute série (échantillons de patients traités avec l'Epi proColon Positive Control et l'Epi proColon Negative Control) est considérée comme valide, si les critères énoncés dans le Tableau 8 sont remplies pour **TOUTES LES TROIS (3)** répétitions de PCR par contrôle.

Si le résultat pour l'Epi proColon Positive Control ou l'Epi proColon Negative Control (ou les deux) n'est pas valide, les données pour les échantillons des patients traités en même temps que les contrôles ne peuvent pas être interprétées. Les essais doivent être répétés pour tous les échantillons des patients inclus dans cette série.

Tableau 8: Limites de validité des séries des Contrôles Epi proColon analysés avec l'Applied Biosystems 7500 Fast / 7500 Fast Dx

Résultat du Contrôle	Détermination	Résultat Septin9	Résultat ACTB
Positive Control valide	PCR1	Ct* 41.1	Ct* 29.8
	PCR2	Ct* 41.1	Ct* 29.8
	PCR3	Ct* 41.1	Ct* 29.8
Negative Control valide	PCR1	Pas de Ct* fourni (“Undetermined”)	Ct* 37.2
	PCR2		Ct* 37.2
	PCR3		Ct* 37.2

*Cycle threshold (Seuil de Cycle)

10.6. Interprétation des Résultats pour une PCR individuelle (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

L'interprétation d'une PCR individuelle est effectuée selon le Tableau 9. Si le résultat du contrôle interne ACTB indique un apport suffisant d'ADN pour une PCR individuelle (seuil de cycle d'ACTB spécifié dans le Tableau 9), le résultat de la PCR Septin9 définit le résultat pour cette PCR individuelle (voir section 13). Une valeur pour ACTB au-dessus des valeurs de seuil de cycle (“Ct”) indiqué dans le Tableau 9 détermine le résultat de cette PCR individuelle comme “PCR invalide".

Tableau 9: Interprétation des Résultats pour une PCR individuelle (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Résultat d'une PCR individuelle	Résultat Septin9	Résultat ACTB
Septin9 Positif	Ct* < 45	Ct* ≤ 32.1
Septin9 Negatif	Pas de Ct* fourni (“Undetermined”)	Ct* ≤ 32.1
Invalide	Tout résultat	Ct* > 32.1

*Cycle threshold (Seuil de Cycle)

11. Analyse avec le Roche LightCycler 480 Instrument I

11.1. Préparation de la Plaque (LightCycler 480 Instrument I)

- Préparer la plaque PCR. La disposition de la plaque, comme indiqué dans le Tableau 6, est recommandée.
- Mettre 15 µl de PCR Master Mix dans les puits souhaités de la plaque de réaction LightCycler 480 Multiwell 96-puits.
- Centrifuger brièvement la plaque de conservation de l'ADNbis créée dans le paragraphe 9.2.13 pendant 1 min à 1000 ± 100 rcf avec une centrifugeuse pour plaque.
- Ajouter 15 µl de solution d'ADNbis dans les puits respectifs de la plaque PCR.
- Sceller la plaque avec une feuille adhésive LightCycler 480.
- Centrifuger brièvement la plaque PCR avec une centrifugeuse pour plaque pendant 1 min à 1000 ± 100 rcf.

Remarque: La plaque PCR ainsi préparée peut être conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 4 heures au maximum.

11.2. Chargement de la Plaque (LightCycler 480 Instrument I)

Remarque: Il est recommandé de sauvegarder un fichier modèle (*.ixo) avec les paramètres définis de cycle et d'analyse.

- Démarrer le logiciel version 1.5.x.
- Créer une nouvelle expérience, cliquer sur "New Experiment"
- Charger le modèle de fichier d'expérience spécifié ou définir l'expérience en fonction des paramètres du programme de PCR décrits dans le Tableau 10 ci-dessous.
- Ouvrir le tiroir.
- Placer la plaque PCR dans le cadre (position A1 va dans le coin supérieur gauche), veiller à ce que la plaque s'insère précisément dans le cadre. Fermer le tiroir.
- Cliquer sur "Start Run" pour commencer.

Table 10: Programme Standard de PCR pour le LightCycler 480 Instrument I.

Program Parameter	Denaturation	Cycling			Cooling
Analysis Mode	None	Quantification Mode			None
Cycles	1	50			1
Segment	1	**1**	**2**	**3**	1
Target [°C]	94	62	56	93	40
Hold [hh:mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None

* LightCycler 480 Instrument I: choisir le "Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe" comme format de détection; activer la combinaison de filtre 483 – 533 nm et 523 – 568 nm et définir le "Reaction Volume" sur "30".

11.3. Paramètres d'Analyse (LightCycler 480 Instrument I)

Remarque: Les utilisateurs du LightCycler 480 Instrument I doivent sélectionner *Color Compensation* sur "ON" et charger le fichier approprié "Epi proColon Color Compensation" pour les combinaisons de filtre "Filter Comb 483 - 533" et "Filter Comb 523 – 568".

Remarque: Effectuer l'analyse des données uniquement sur les puits utilisés en créant un sous échantillon respectif de la façon décrite dans le manuel du LightCycler 480 Instrument I.

- Cliquer sur "Analysis" de la barre du module du logiciel de base LightCycler 480 afin d'ouvrir la fenêtre "Analysis Overview".

- Sélectionner “Abs Quant/Fit Points” pour tous les échantillons.
- Activer “Epi proColon Color Compensation”.
- Activer le “Filter Comb 483-533”.
- Régler le “First Cycle“ sur “1“ et le “Last Cycle“ sur “50“.
- Régler le bruit de fond (cliquer sur le bouton bleu “Background”) sur “5-22” en réglant “Min Offset” sur “4” et “Max Offset” sur “21” dans la fenêtre “Cycle Range”.
- Régler le seuil du bruit de fond sur ”Noise Band (Fluoresc)” et régler le seuil du bruit de fond manuellement sur “1.6” dans la fenêtre “Noise Band”
- Après sélectionner “Treshold (Manual)“ dans la fenêtre “Analysis ”, fixer la valeur limite sur “1.6”.
- Régler le nombre de Fit Points sur “2“ dans la fenêtre “Analysis“.
- Cliquer sur “Calculate”.

  Le **Crossing Point (“CP”)** de **SEPT9** pour chaque échantillon est automatiquement calculé et apparaît dans le Tableau des Echantillons.

Remarque: Si le bruit de fond est supérieur à 1.6, ou si les courbes d’amplification restent en dessous de 1.6, régler le seuil de façon à ce qu’il soit légèrement supérieur au bruit de fond pour assurer une lecture correcte. Les courbes d’amplification sans hausse exponentielle significative doivent être considérées comme négatives

- Exporter les valeurs CP en cliquant sur le Tableau des Echantillons en utilisant la touche droite de la souris. Choisir “Export”. Sauvegarder le fichier des données sous un nom unique et pertinent.
- Activer le “Filter Comb 523-568”.
- Régler le “First Cycle“ sur “1“ et le “Last Cycle“ sur “50“.
- Régler le bruit de fond (cliquer sur le bouton bleu “Background”) sur “5-22” en réglant “Min Offset” sur “4” et “Max Offset” sur “21” dans la fenêtre “Cycle Range”.
- Régler le seuil du bruit de fond sur ”Noise Band (Fluoresc)” et régler seuil du bruit de fond manuellement sur “0.8” dans la fenêtre “Noise Band”.
- Après sélectionner “Treshold (Manual)“ dans la fenêtre “Analysis ”, fixer la valeur limite sur “0.8”.
- Régler le nombre de Fit Points sur “2“ dans la fenêtre “Analysis“.
- Cliquer sur “Calculate”.

  Les **valeurs CP du gène ACTB** pour chaque échantillon sont automatiquement calculées et apparaissent dans le Tableau des Echantillons.

Remarque: Si le bruit de fond est supérieur à 0.8, ou si les courbes d’amplification restent en dessous de 0.8, régler le seuil de façon à ce qu’il soit légèrement supérieur au bruit de fond pour assurer une lecture correcte. Les courbes d’amplification sans hausse exponentielle significative doivent être considérées comme négatives.

- Exporter les valeurs CP en cliquant sur le Tableau des Echantillons au moyen de la touche droite de la souris. Choisir “Export”. Sauvegarder le fichier des données sous un nom unique et pertinent.

11.4. Validité de la Série en utilisant les Contrôles Epi proColon (LightCycler 480 Instrument I)

Toute série (échantillons de patients traités avec l'Epi proColon Positive Control et l'Epi proColon Negative Control) est considérée comme valide, si les critères énoncés dans le Tableau 11 sont remplies pour **TOUTES LES TROIS (3)** répétitions de PCR par contrôle.

Si le résultat pour l'Epi proColon Positive Control ou l'Epi proColon Negative Control (ou les deux) n'est pas valide, les données pour les échantillons des patients traités en même temps que les contrôles ne peuvent pas être interprétées. Les essais doivent être répétés pour tous les échantillons des patients inclus dans cette série.

Tableau 11: Limites de validité des séries des Contrôles Epi proColon analysés(LightCycler 480 Instrument I)

Résultat du Control	Détermination	Résultat Septin9	Résultat ACTB
Positive Control valide	PCR1 PCR2 PCR3	CP* ≤ 40.6 CP* ≤ 40.6 CP* ≤ 40.6	CP* ≤ 29.5 CP* ≤ 29.5 CP* ≤ 29.5
Negative Controle valide	PCR1 PCR2 PCR3	Pas de CP* fourni	CP* ≤ 36.5 CP* ≤ 36.5 CP* ≤ 36.5

*Crossing Point (Seuil de Cycle)

11.5. Interprétation des Résultats pour une PCR individuelle (LightCycler 480 Instrument I)

Si le résultat du contrôle interne ACTB indique un apport suffisant d'ADN pour une PCR individuelle (seuil de cycle d'ACTB spécifié dans le Tableau 12), le résultat de la PCR Septin9 définit le résultat pour cette PCR individuelle (voir section 13). Une valeur pour ACTB au-dessus des valeurs de seuil de cycle ("CP") indiqué dans le Tableau 12 détermine le résultat de cette PCR individuelle comme "PCR invalide".

Tableau 12: Interprétation des Résultats pour une PCR individuelle (LightCycler 480 Instrument I)

Résultat d'une PCR individuelle	Résultat Septin9	Résultat ACTB
Septin9 Positif	CP* < 50	CP* ≤ 33.1
Septin9 Negatif	Pas de CP* fourni	CP* ≤ 33.1
Invalide	Tout résultat	CP* > 33.1

*Crossing Point (Seuil de Cycle)

12. Analyse avec le Roche LightCycler 480 Instrument II

12.1. Préparation de la Plaque (LightCycler 480 Instrument II)

- Préparer la plaque PCR. La disposition de la plaque, comme indiqué dans le Tableau 6, est recommandée.
- Mettre 15 µl de PCR Master Mix dans les puits souhaités de la plaque de réaction LightCycler 480 Multiwell 96-puits
- Centrifuger brièvement la plaque de conservation de l'ADNbis créée dans le paragraphe 9.2.13 pendant 1 min à 1000 ± 100 rcf avec une centrifugeuse pour plaque.
- Ajouter 15 µl de solution d'ADNbis dans les puits respectifs de la plaque PCR.
- Sceller la plaque avec une feuille adhésive LightCycler 480.
- Centrifuger brièvement la plaque PCR avec une centrifugeuse pour plaque pendant 1 min à 1000 ± 100 rcf.

Remarque: La plaque PCR ainsi préparée peut être conservée au réfrigérateur à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 4 heures au maximum.

12.2. Chargement de la Plaque (LightCycler 480 Instrument II)

Remarque: Il est recommandé de sauvegarder un fichier modèle (*.ixo) avec les paramètres de cycle et d'analyse définis.

- Démarrer le logiciel version 1.5.x.
- Créer une nouvelle expérience, cliquer sur "New Experiment"
- Charger le modèle de fichier d'expérience spécifié ou définir l'expérience en fonction des paramètres du programme de PCR décrits dans le Tableau 13 ci-dessous.
- Ouvrir le tiroir.
- Placer la plaque PCR dans le cadre (position A1 va dans le coin supérieur gauche), veiller à ce que la plaque s'insère précisément dans le cadre. Fermer le tiroir.
- Cliquer sur "Start Run" pour commencer.

Tableau 13: Programme PCR Standard pour le LightCycler 480 Instrument II.

Program Parameter	Denaturation	Cycling			Cooling
Analysis Mode	None	Quantification mode			None
Cycles	1	50			1
Segment	1	**1**	**2**	**3**	1
Target [°C]	94	62	56	93	40
Hold [hh:mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None

* LightCycler 480 Instrument II: choisir le "Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe" comme format de détection; activer la combinaison de filtre 465 – 510 nm et 533 – 580 nm et définir le "Reaction Volume" sur "30".

12.3. Paramètres d'Analyse (LightCycler 480 Instrument II)

Remarque: Effectuer l'analyse des données uniquement sur les puits utilisés en créant un sous échantillon respectif de la façon décrite dans le manuel du LightCycler 480 Instrument II.

- Cliquer sur "Analysis" de la barre du module du logiciel de base LightCycler 480 afin d'ouvrir la fenêtre "Analysis Overview".
- Sélectionner "Abs Quant/Fit Points" pour tous les échantillons.
- Activer le "Filter Comb 465 – 510".

- Régler le "First Cycle" sur "1" et le "Last Cycle" sur "50".
- Régler le bruit de fond (cliquer sur le bouton bleu " Background ") sur "5 - 22" en réglant le "Min Offset" sur "4" et le "Max Offset" sur "21" dans la fenêtre "Cycle Range".
- Régler le seuil du bruit de fond sur "Noise Band (Fluoresc)" et régler seuil du bruit de fond manuellement sur "2.0" dans la fenêtre "Noise Band".
- Après sélectionner "Treshold (Manual)" dans la fenêtre "Analysis", fixer la valeur limite sur "2.0".
- Régler le nombre de Fit Points sur "2" dans la fenêtre "Analysis".
- Cliquer sur "Calculate".

  Le **Crossing Point ("CP")** de **SEPT9** pour chaque échantillon est automatiquement calculé et apparaît dans le Tableau des Echantillons.

Remarque: Si le bruit de fond est supérieur à 2.0, ou si les courbes d'amplification restent en dessous de 2.0, régler le seuil de façon à ce qu'il soit légèrement supérieur au bruit de fond pour assurer une lecture correcte. Les courbes d'amplification sans hausse exponentielle significative doivent être considérées comme négatives.

- Exporter les valeurs CP en cliquant sur le Tableau des Echantillons en utilisant la touche droite de la souris. Choisir "Export". Sauvegarder le fichier des données sous un nom unique et pertinent.
- Activer le "Filter Comb 533 - 580".
- Régler le "First Cycle" sur "1" et le "Last Cycle" sur "50".
- Régler le bruit de fond (cliquer sur le bouton bleu "Background") sur "5 - 22" en réglant le "Min Offset" sur "4" et le "Max Offset" sur "21" dans la fenêtre "Cycle Range".
- Régler le seuil du bruit de fond sur "Noise Band (Fluoresc)" et régler seuil du bruit de fond manuellement sur "2.0" dans la fenêtre "Noise Band".
- Après sélectionner "Treshold (Manual)" dans la fenêtre "Analysis ", fixer la valeur limite sur "2.0".
- Régler le nombre de Fit Points sur "2" dans la fenêtre "Analysis".
- Cliquer sur "Calculate".

  Les **valeurs CP du gène ACTB** pour chaque échantillon sont automatiquement calculées et apparaissent dans le Tableau des Echantillons.

Remarque: Si le bruit de fond est supérieur à 2.0, ou si les courbes d'amplification restent en dessous de 2.0, régler le seuil de façon à ce qu'il soit légèrement supérieur au bruit de fond pour assurer une lecture correcte. Les courbes d'amplification sans hausse exponentielle significative doivent être considérées comme négatives.

- Exporter les valeurs CP en cliquant sur le Tableau des Echantillons en utilisant la touche droite de la souris. Sélectionner "Export". Sauvegarder le fichier des données sous un nom unique et pertinent.

12.4. Validité du Résultat du Test Epi proColon pour la Série exécutée (LightCycler 480 Instrument II)

Toute série (échantillons de patients traités avec l'Epi proColon Positive Control et l'Epi proColon Negative Control) est considérée comme valide, si les critères énoncés dans le Tableau 14 sont remplies pour **TOUTES LES TROIS (3)** répétitions de PCR par contrôle.

Si le résultat pour l'Epi proColon Positive Control ou l'Epi proColon Negative Control (ou les deux) n'est pas valide, les données pour les échantillons des patients traités en même temps que les contrôles ne peuvent pas être interprétées. Les essais doivent être répétés pour tous les échantillons des patients inclus dans cette série.

Tableau 14: Limites de validité des séries des Contrôles Epi proColon analysés (LightCycler 480 Instrument II)

Résultat du Control	Détermination	Résultat Septin9	Résultat ACTB
Positive Control valide	PCR1	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
	PCR2	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
	PCR3	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
Negative Control valide	PCR1	pas de CP* fourni	CP* ≤ 37.1
	PCR2		CP* ≤ 37.1
	PCR3		CP* ≤ 37.1

*Crossing Point (Seuil de cycle)

12.5. Interprétation des Résultats pour une PCR individuelle (LightCycler 480 Instrument II)

Si le résultat du contrôle interne ACTB indique un apport suffisant d'ADN pour une PCR individuelle (seuil de cycle d'ACTB spécifié dans le Tableau 15), le résultat de la PCR Septin9 définit le résultat pour cette PCR individuelle (voir section 13). Une valeur pour ACTB au-dessus des valeurs de seuil de cycle ("CP") indiqué dans le Tableau 15 détermine le résultat de cette PCR individuelle comme "PCR invalide".

Tableau 15: Interprétation des Résultats pour une PCR individuelle (LightCycler 480 Instrument II).

Résultat d'une PCR individuelle	Résultat Septin9	Résultat ACTB
Septin9 Positif	CP* < 50	CP* ≤ 33.7
Septin9 Negatif	Pas de CP* fourni	CP* ≤ 33.7
Invalide	tout résultat	CP* > 33.7

*Crossing Point (Seuil de cycle)

13. Interprétation des Résultats pour un Echantillon de Patient

Le résultat du test pour un échantillon de patient est interprété selon le Tableau 16. Le résultat du test pour un échantillon de patient est "positif", si au moins deux des trois PCR faites en parallèle sont Septin9 positives. Le résultat du test pour un échantillon de patient est "négatif", si au moins deux des trois PCR faites en parallèle sont Septin9 négatives. Le résultat du test est "invalide" dans tous les autres cas.

Tableau 16: Interprétation des Résultats du Test Epi proColon 2.0 CE

Résultat du Test	Contrôle Positif Contrôle Négatif	Résultats de PCR individuelle
POSITIF	Valide	Au moins deux PCRs Septin9 positives
NEGATIF	Valide	Au moins deux PCRs Septin9 négatives
INVALIDE	Valide	Tout autre cas
INVALIDE	Invalide	n/a

14. Contrôle Qualité

14.1. Contrôles Externes

Le kit Epi proColon 2.0 CE contient l'Epi proColon Positive Control et l'Epi proColon Negative Control (M5-02-003). Ces contrôles doivent être utilisés lors de chaque test afin de contrôler la bonne réalisation du test et de garantir la validité des résultats. L'Epi proColon Positive Control et l'Epi proColon Negative Control doivent se situer dans leurs limites de validité spécifiées (voir Tableau 8, ou Tableau 11, ou Tableau 14). Si un contrôle se situe en dehors de ses limites de validité, les résultats des tests afférents sont invalides et ne peuvent pas être pris en compte. Dans ce cas, le test doit être répété.

Si les procédures de contrôle qualité au sein de votre laboratoire exigent une utilisation de contrôles plus fréquente pour la vérification des résultats de tests, veuillez respecter ces instructions.

14.2. Contrôles internes

Le contrôle interne sert à mettre en évidence l'ADN converti au bisulfite de l'ACTB (ß-actine). Ce contrôle interne co-amplifié vérifie la qualité de l'échantillon, sa préparation et détermine si la concentration d'ADN dans l'échantillon est suffisante.

Le résultat de la PCR de SEPT9 est lié à une valeur Ct ou CP de la PCR du gène ACTB (voir Tableau 9, ou Tableau 12, ou Tableau 15). Des valeurs Ct ou CP pour la PCR d'ACTB en dehors de la plage spécifiée invalident le résultat pour la PCR individuelle; du fait que ces valeurs élevées sont associées à une très faible teneur en ADNbis ou une inhibition de la PCR.

15. Limites de la Procédure

- Pour un usage diagnostic *in vitro* seulement.
- Ce produit a été validé pour une utilisation combiné de l’Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), l’Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002), et l’Epi proColon Control Kit (M5-02-003) seulement. Les composants de ce test ne doivent pas être remplacés par d'autres méthodes d'extraction d'ADN ou d’autres kits de PCR
- Ce produit a été validé pour une utilisation avec du plasma dérivé de sang recueilli avec des tubes de collecte BD Vacutainer® K_2EDTA, S-Monovette® 9 ml potassium-EDTA et S-Monovette® 8,5 ml CPDA. L’utilisation d’autres types d'échantillon et d'autres tubes de prélèvement sanguin n'ont pas été validés.
- L'utilisation de ce produit est limitée à un personnel expérimenté et formé aux tests de PCR.
- La détection du cancer colorectal dépend de la quantité de l'ADN tumoral circulant dans l'échantillon et peut être affectée par les méthodes de prélèvement de l'échantillon et de conservation de l’échantillon, des facteurs liés au patient (à savoir l’âge, d'autres maladies) et le stade tumoral.
- Les résultats ne sont pas des preuves confirmatives de la présence ou l'absence de cancer colorectal. Tout résultat positif du test Epi proColon 2.0 CE doit être confirmé par coloscopie ou une sigmoïdoscopie.
- Les résultats de tests positifs ont été observés chez des patients cliniquement diagnostiqués avec des maladies suivantes: gastrite chronique, œsophagite, polyarthrite non rhumatoïde, cancer du poumon, cancer du sein et cancer de la prostate.
- Le résultat du test Epi proColon 2.0 CE doit être évalué en conjonction avec d'autres paramètres cliniques.

16. Caractéristiques de Performance

16.1. Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique a été évaluée par 3 opérateurs effectuant chacun 4 séries indépendantes avec un jeu de 2 x 7 échantillons à la limite technique de détection (LDD) contenant de l'ADN HeLa (Septin9 positif) à des concentrations de 0, 6, 12, 18, 25, 35 et 50 pg/ml résultant dans 168 déterminations de Septin9. Toutes les déterminations sur l’Applied Biosystems 7500 Fast Dx avec SDS v1.4 étaient valides. 133 des 144 échantillons LDD avec de l’ADN HeLa ajouté étaient positifs et 24 des 24 échantillons sans ADN HeLa ajouté ont été négatifs. La LDD_{95} estimé a été déterminé par un modèle de régression logistique à 14 pg / ml (IC 95%: 9 pg/ml - 19 pg/ml) pour l'Epi proColon 2.0 CE.

Une configuration similaire expérimentale a été utilisée pour déterminer la sensibilité analytique en utilisant l’appareil LightCycler 480 Instrument I. La LDD_{95} estimée a été déterminée comme étant équivalente.

16.2. Reproductibilité

La reproductibilité de la procédure a été vérifiée par la répétition des essais sur neuf pools d´échantillons issus de plasma EDTA humain. Six de ces pools de plasma étaient constitués de plasma de patients diagnostiqués avec un cancer colorectal. Les trois autres pools utilisés comme control étaient constitués de plasma de patients sans maladie apparente. Chaque pool de plasma était traité en 6 répétitions par trois opérateurs utilisant différents lots de fabrication de l'Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), ainsi que l'Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002). Pour 54 des 54 déterminations de Septin9 le résultat attendu (pool cancer: Septin9 positif; pool non cancéreux: Septin9 négatif) a été systématiquement généré.

16.3. Sensibilité et Spécificité Clinique

La performance clinique de l'Epi proColon 2.0 CE a été déterminée avec 149 échantillons cliniques ne présentant aucun signe de maladie choisis parmi une population de dépistage à risque moyen recueillie de façon prospective et avec 197 échantillons cliniques dans une étude cas-témoin comprenant des échantillons provenant de patients avec un carcinome colorectal de tous les stades histologiquement

confirmés et des échantillons des individus vérifiés par coloscopie négative et ne présentant aucun signe de maladie.

L'ADN converti au bisulfite a été préparé à partir de plasma dérivé de sang traité dans un délai de quatre heures après la prise de sang avec des tubes Vacutainer® K_2EDTA (Becton Dickinson). Des mesures valides pour Septin9 ont été obtenues pour 346 sur 346 spécimens (100%).

Dans la cohorte recueillie de façon prospective, 1 échantillon sur les 149 a fourni un résultat positif au test. L'estimation de taux de faux positifs dans ce groupe de patients est de 1% (IC 95%: 0% - 4%). Ces chiffres se traduisent par une spécificité clinique de 99% (IC 95%: 96% - 100%).

Parmi les 99 sujets de la cohorte de cas-témoins ne présentant aucun signe de maladie (les contrôles), 96 spécimens ont été déterminés d'être Septin9 négatif résultant d'une spécificité clinique estimée de 97 % (IC 95 %: 91 % - 99 %), voir le Tableau 17.

Parmi les 98 sujets diagnostiqués avec un cancer colorectal, 79 spécimens ont été déterminés d'être positifs pour Septin9 résultant d'une sensibilité clinique estimée de 81 % (IC 95 %: 72 % - 87 %). Dans des cancers colorectaux de stade précoce localisés, le test Epi proColon 2.0 CE était positif dans 43 (18 de stade I, 25 stade II) des 56 patients (77 %).

Le tableau suivant récapitule ces résultats.

Tableau 17. Résumé des données de performance clinique de l'Epi proColon 2.0 CE

	Contrôles (cohorte de dépistage)	**Contrôles (cas-témoins)**	**Tous carcinomes colorectaux**	**Carcinomes colorectaux localisés**
Résultats valides	149	99	98	56
Septin9 positif	1	3	79	43
Septin9 négatif	148	96	19	13
Positivité	1%	3%	81%	77%

16.4. **Concordance des deux Appareils de PCR en Temps Réel**

La concordance d'Epi proColon 2.0 CE sur le système Applied Biosystems 7500 Fast Dx et le LightCycler 480 Instrument I a été déterminée dans une mesure parallèle avec 48 échantillons de plasma provenant de patients atteints d'un carcinome colorectal de tous les stades histologiquement confirmés et 52 échantillons provenant de sujets sans maladie apparente du côlon qui ont été vérifiés par coloscopie. Dans 93% (93/100) des cas, les deux systèmes de mesure ont généré des résultats concordants pour Septin9.

16.5. **Interférence**

Aucune interférence n'a été observée dans des contrôles expérimentaux et des échantillons non réactifs ou réactifs testés avec des niveaux élevés d'ADN génomique non-méthylé (100 ng/ml), de bilirubine (0,20 mg/ml), d'hémoglobine (1 mg/ml), de triglycéride (12 mg/ml), de protéine (Albumine du sérum humain)(120 mg/ml), de globules rouges (0,4% v/v), de K_2EDTA (20 mg/ml), de Cholestérol (5 mg/ml), d'acide urique (0,235 mg/ml), et de glucose (10 mg/ml).

17. Signification des Symboles utilisés

	Veuillez suivre les instructions
REF	Référence du Kit
IVD	Destiné aux examens diagnostiques *in vitro*
LOT	Numéro de lot
	Date de péremption
	Fabricant
	Conserver à la température indiquée
Σ	Nombre de tests

18. Références

1 deVos, T et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. Clinical Chemistry 55:7, 1337-46 (2009)

2 Lofton-Day, C. et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. Clinical Chemistry 54:2, 414-423 (2008)

3 Model, F. et al. Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. Mol Cancer Res 5, 153-163 (2007)

4 Eads, C.A. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Research, Volume 28, Issue 8, e32 (2000)

19. Pour nous contacter

Epi proColon 2.0 CE est fabriqué par :

Epigenomics AG

Kleine Präsidentenstrasse 1

10178 Berlin, Germany

Pour obtenir de plus amples informations et pour toute assistance, veuillez adresser un courriel à l’adresse suivante ou composez le numéro de téléphone suivant :

support@products.epigenomics.com

Phone: +49 30 24345 222

Fax: +49 30 24345 555

Informations pour le Client

En achetant ce produit, le client, conformément à certains brevets de Roche, obtient la permission, d’utiliser celui-ci seulement pour des services de diagnostic in vitro sur l’homme. Aucun brevet général ou autre licence de tout autre nature que ce droit spécifique d’utilisation de l'achat est accordée par les présentes.

Le LightCycler® 480 System est une marque déposée de l’entreprise F. Hoffmann-La Roche Ltd.

The Applied Biosystems®, MicroAmp® est une marque déposée de l’entreprise Life Technologies Corporation; DynaMag™ est une marque de l’entreprise Life Technologies Corporation.

BD Vacutainer® est une marque déposée de l’entreprise Becton Dickinson Inc./Corporation.

S-Monovette® est une marque déposée de l’entreprise Sarstedt AG & Co.

Thermomixer®, Research®, Reference®, Multipette®, ep Dualfilter T.I.P.S®, Combitips plus® est une marque déposée de l’entreprise Eppendorf AG; Safe Lock™ est une marque de l’entreprise Eppendorf AG.

HandyStep® est une marque déposée de l’entreprise Brand GmbH + Co KG.